

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-049091

(43)Date of publication of application : 19.02.1990

(51)Int.Cl.

C09K 15/08
A23L 3/3499
A61K 7/00
A61K 31/12
A61K 31/12
A61K 31/12

(21)Application number : 63-198947

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 11.08.1988

(72)Inventor : UCHIUMI KOUZOU
INOUE MASAYASU
MIKI WATARU
TANAKA TAKAHARU
HIGUCHI NAOKI

(54) ASTAXANTHIN -CONTAINING COMPOSITION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject composition, containing astaxanthin (ester) as an active ingredient and capable of providing an antioxidant, medicine for protecting oxidative tissual disorder and anti-inflammatory agent.

CONSTITUTION: The objective composition containing astaxanthin consisting of a natural or synthetic product consisting of an extracted essence obtained by extracting red yeast, *Tigriopus japonicus* Mori (red water flea) or krill with ethanol, acetone, etc., and/or esters thereof, such as oleate, palmitate or stearate, as an active ingredient. Furthermore, culture conditions for producing the astaxanthin (ester) using the red yeast may be 15-27° C for 3-7 days under aerobic conditions and liquid pH of a culture medium is preferably kept at 4.0-9.5.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-49091

⑬ Int. Cl.

C 09 K 15/08
A 23 L 3/3499
A 61 K 7/00

31/12

識別記号

ABA
ABE
ADS

庁内整理番号

C
W

7215-4H
7329-4B
7306-4C
7306-4C
7330-4G
7330-4C
7330-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)2月19日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全11頁)

⑮ 発明の名称 アスタキサンチン含有組成物

⑯ 特 願 昭63-198947

⑰ 出 願 昭63(1988)8月11日

⑱ 発 明 者	内 海 耕 健	高知県高知市高須1823-1-A-402
⑱ 発 明 者	井 上 正 康	熊本県熊本市池田3-49-3
⑱ 発 明 者	幹 渉	兵庫県神戸市兵庫区大開通5-1-15
⑱ 発 明 者	田 中 隆 治	大阪府大阪市東淀川区東淡路1-5-1-801
⑱ 発 明 者	樋 口 直 樹	大阪府池田市石橋2-13-23-1-305
⑲ 出 願 人	サントリー株式会社	大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
⑲ 代 理 人	弁理士 青 木 朗	外4名

明 細 書

1. 発明の名称

アスタキサンチン含有組成物

2. 特許請求の範囲

1. アスタキサンチンもしくはそのエステル又はその両者を有効成分とする酸化防止剤。

2. アスタキサンチンもしくはそのエステル又はその両者を有効成分とする生体の酸化的組織障害を防御するための医薬。

3. アスタキサンチンもしくはそのエステル又はその両者を有効成分とする抗炎症剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、天然物であるアスタキサンチン及び／またはそのエステルを有効成分として含有する酸化防止剤、生体の酸化的組織障害を防御するための医薬、及び抗炎症剤に関するものである。アスタキサンチン及び／またはそのエステルを天然有効成分として含有する酸化防止剤は、その安全性や酸化防止能力により主に食品、化粧品及び医

薬活性物質のための酸化防止成分として、並びに生体の酸化的組織障害を防御するための医薬活性成分として利用することができる。またアスタキサンチン及び／またはそのエステルを天然有効成分として含有する抗炎症剤は、その安全性や強い抗炎症効果により主に機能性食品、化粧品、及び医薬品における抗炎症成分として利用することができる。特にビタミンE欠乏によって引き起こされる炎症等の諸症状に対して有効である。さらにアスタキサンチン及び／またはそのエステルを天然有効成分として含有する抗変異原剤は、その安全性や抗変異原効果により主に機能性食品、化粧品、及び医薬品における抗変異原成分として利用することができる。

(従来の技術及び課題)

従来より食品、化粧品、医薬、あるいは油脂等の酸化を防止するために酸化防止剤が数多く考案、製造されているが、それら酸化防止剤の中でもブチルヒドロキシアニソール(以下BHAと略す)

が主に用いられてきた。しかし近年安全性の問題から食品への使用を禁止する行政処置が取られたため、BHAと同等の酸化防止能力を持ち、かつ安全な酸化防止剤の開発が望まれている。

BHAに代えて使用できる酸化防止剤としては、その安全性等の点から天然物が最も好まれ、天然酸化防止剤であるトコフェロールを用いる方法

(例えば特開昭61-289835)が数多く試みられている。このような試みの一つとして、多水分子の食品には分散しにくい脂溶性のトコフェロールを水中油(O/W)型のエマルジョンにしてこの欠点を克服した製品が登場した。ところがこの製品は酸化防止力の点でBHAと比較して見劣りがし、しかも一定の酸化防止力を示すのに多量の製品を必要とする点においてもその使用が大きく制限されていた。そのためシナジスト(相乗因)としてレーアスコルビン酸、クエン酸、没食子酸等を添加し、トコフェロールとの相乗効果により酸化防止力を高めようとの試みがなされ、特にトコフェロール、レーアスコルビン酸、および没食子酸を

含有する乳液状酸化防止剤等が開発されたが、やはり酸化防止力の点でBHAには及ばないものであった。

一方、生体内においては種々の原因により酵素的、あるいは非酵素的に活性酸素が生産される。この活性酸素は生体膜系に攻撃を加え、構成要素の多価不飽和脂肪酸を過酸化することにより機能障害をもたらす。例えば高圧酸素療法、高濃度酸素吸入、循環の再開などは細胞内の二酸化炭素の上昇のため活性酸素の産生を高めて酸素中毒、未熟児網膜症、脳障害など生ずる。また酸素不足は電子伝達系よりの電子の放出を誘発し活性酸素を生じ、ショック、心筋梗塞、脳梗塞などを誘発する。またバラコード、アドリアマイシンなどの活性酸素産生を刺激する薬物は肺障害を誘発する。ビタミンEやAの不足も活性酸素の細胞内産生を促進して種々の病態の原因となる。さらに多核白血球やマクロファージによって産生された活性酸素が細胞外へ遊離されると、代表的な病態として炎症(急性、慢性)が誘発される(以上、医学の

あゆみ、第129巻、1214頁、1984)ことも分かっている。

また、トコフェロールはビタミンEとして生体内で数多くの有益な作用を示し、外用としても外傷や火傷に起因する炎症等を緩和しその治癒を早め深い傷跡が残るのを防ぐという効果を示すが、さらに強い酸化防止能力や抗変異原効果を示し、内服、外用としての効果をも示す安全な化合物があれば産業上の利用分野は計り知れない。

〔課題を解決するための手段〕

そこで本発明者らは自然界より、高い酸化防止活性を示し、かつ高安全性の化合物を鋭意探索した結果、主に魚類や家畜の飼料への添加剤として(例えば特開昭57-206342または特開昭60-54647)よく使用され、カロチノイドの一種として公知である、アスタキサンチン及びそのエステルが、非常に強力な酸化防止活性を示すことを発見した。そして、この酸化防止活性は、食品、化粧品及び医薬活性物質のための酸化防止成分としてのみな

らず、生体の酸化的組織障害を防止するための医薬活性成分としても使用できることを確認した。

また、アスタキサンチン及びそのエステルはごく少量で抗炎症効果を有するので、抗炎症剤としても有効であることも見出した。

従って、本発明はアスタキサンチンもしくはそのエステル又はその両者を有効成分とする酸化防止剤、生体の酸化的組織障害を防衛するための医薬、及び抗炎症剤を提供するものである。

〔具体的な説明〕

本発明によれば、アスタキサンチン及び/またはそのエステルを有効成分として含有する酸化防止剤、抗炎症剤及び抗変異原剤が提供される。

アスタキサンチン及びそのエステルは、海老の卵(Kuhnら、Angew. Chem. 51, 465(1938)またはBer. 71, 1879(1938)、動物の臓器(Kuhnら、Ber. 72, 1688(1939))、植物(Tischerら、Z. Physiol. Chem. 267, 281(1941)、福寿草や金鳳花の花弁(Seyboldら、Nature 184, 1714, (1959))、

鳥の赤い羽根 [Z. Physiol. Chem. 288, 20 (1951)] 等より発見されているもので、その構造は決定され (Grangaud, Compt. Rend. 242, 1767, (1956) または Andrews ら、Acta. Chem. Scand. B28, 730 (1974))、合成法も確立されており (Cooper ら、J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1975, 2195, Kienzle ら、Helv. Chim. Acta 61, 2609 (1978), Widaer ら、Helv. Chim. Acta 64, 2405 (1981), Nayer ら、Helv. Chim. Acta 64, 2419 (1981))、化学合成品としても、入手は容易である。本発明における該有効成分は化学的に合成されたアスタキサンチンでも、またアスタキサンチン及びそのエステルを含有する赤色酵母、ティグリオパス (赤ミジンコ)、あるいはオキアミよりの抽出物、特に有機溶媒、肝ましくはエタノールやアセトン抽出エキスの状態であってもよく、また必要により適宜精製して使用することも可能である。例えば、以下に記載するようにファフィア酵母 (*Phaffia rhodozyma* Miller) を適当な培地で培養し、その培養物から分離精製する。

アスタキサンチンのエステルとしては例えばオ

レイン酸エステル、パルミチン酸エステル、ステアリン酸エステル等が挙げられる。

赤色酵母 (*Phaffia rhodozyma* Miller) を用いて、アスタキサンチン及びそのエステルを製造する際に使用される培地は、液状でも固状でもよいが、通常は液体培地による振盪培養または通気攪拌培養が便利である。培地は赤色酵母が生育して菌体内にアスタキサンチン及びそのエステルを蓄積するものであればどのようなものでもよい。即ち、炭素源としては、例えばグルコース、ラクトース、グリセリン、デンプン、シュクロース、デキストリン、糖蜜、有機酸類などが、また窒素源としては、例えばペプトン、カザミノ酸などの蛋白質加水分解物、肉エキス、酵母エキス、大豆粕、コーンステイプリカー、アミノ酸類、アンモニウム塩、硝酸塩その他の各種有機あるいは無機窒素化合物が用いられる。無機塩としては各種磷酸塩、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムを添加してもよく、また菌の生育を促進する目的でビタミン類、核酸関連化合物などを添加してもよい。

なお、シリコン、ポリプロピレングリコール誘導体、大豆油などの消泡剤を培地に添加することが本発明物質の蓄積量を増大させるのに効果的な場合もある。

培養にあたっては、いきなり本培養するよりは予め小規模な前培養を行って得られる培養物を培地に接種するのが望ましい。培養温度、培養期間、培養の液性などの条件は、本発明物質の蓄積量が最大となるように適当に選択、調節されるが、多くの場合、好氣的条件下に 15℃～27℃、3～7 日の培養でよく、また培地の液性は 4.0～9.5 に保つのがよい。

このように培養することにより、菌体中にアスタキサンチン及びそのエステルが生成蓄積される。液体培地を用いて培養した場合は、主としてその菌体部分に目的物が蓄積されるので、培養物を一旦遠心あるいは遠心分離して菌体を集めた後、一度または数度水で洗浄する。このようにして得られた菌体を物理的手法を用いて破砕した後乾燥し、あるいは破砕しないで直接乾燥する。乾燥菌体あ

るいはその破砕物からの目的物の分離、精製には、アスタキサンチン及びそのエステルの化学的特性に基づく種々の手段が採択される。すなわち、例えば n-ブタノールなどの水とは任意に混合せず、しかも本発明物質を溶解しうる有機溶媒による抽出、メタノール、エタノールあるいはアセトンなどの極性の大きい溶媒への溶解等がある。特に好ましい抽出法としては有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、あるいはアセトンを用いた菌体抽出である。抽出溶媒は通常乾燥菌体、あるいは破砕物に対して重量で 3～5 倍の割合で用い、室温にて半日～一日の間攪拌による抽出を 2～3 回繰り返せば充分である。ついでこの全抽出液を 40℃以下で減圧濃縮し乾燥すると、アスタキサンチン及びそのエステルを含有する油状の粗抽出エキスが得られる。この粗抽出エキス中のアスタキサンチン及びそのエステルの含量は用いる抽出条件によって変化するが、通常 5～10% 程度である。さらにこの粗抽出液から目的物を精製するには用途によりヘキサンなどで処理することによ

る不純物の除去、セファデックス類によるゲル濾過、イオン交換樹脂、イオン交換セルロース、イオン交換セファデックスなど各種イオン交換体によるイオン交換クロマトグラフィー、アルミナ、シリカゲル、シアノプロピル、オクタデシルシリカゲル、アンバーライトー XAD-1、2などの吸着剤を用いる吸着クロマトグラフィーなどが有効に用いられ、これら手段を適当に組み合わせて使用することにより、本発明物質は単離される。但し、これら以外の方法であっても本発明物質の特性を有効に利用するものであれば適宜使用できる。特に好ましい吸着剤としては、ダイヤイオンHP-20、セファデックスLH-20、コスモシル10C18、ヴォレムドライカラム用シリカゲル、デュボンソルボックス-CN、あるいはエルマ PRC-CNの組合せが挙げられる。

本発明のアスタキサンチンの酸化防止剤としての利用、あるいは抗炎症剤としての利用は前記の粗抽出エキスあるいは精製したアスタキサンチンを使用してもよい。粗抽出エキスあるいは精製し

用されるアスタキサンチンは化学的に合成されたアスタキサンチンでも天然よりのアスタキサンチン及びそのエステル粗抽出エキスでもよく、これらを単独で、または適宜組み合わせて用いることができる。アスタキサンチン及びその粗抽出エキスはエタノールに溶解し、水で希釈した後これを直接使用することができるが、必要に応じて乳液状製剤を調製することができる。乳液状製剤を調製するに当たっては水相部に没食子酸、L-アスコルビン酸（あるいはそのエステルまたは塩）、ガム質（例えばローカストビーンガム、グァーガム、またはゼラチン等）、さらにビタミンP（例えばヘスペリジン、ルチン、ケルセチン、カテキン、シアニジン、エリオジクテン等のフラボノイドあるいはその混合物）などを、また油相部にはアスタキサンチンあるいはアスタキサンチン粗抽出液、またはその混合物を添加し、さらにグリセリン脂肪酸エステルまたは油脂、例えば菜種油、大豆油、コーン油等の通常の液状油を加えて乳化することにより容易に調製することが可能である。

たアスタキサンチンを使用する場合、それ自体が油状であるため常法に従って前記有効成分を浮剤化あるいはシナジストとなるような化合物を加えて浮剤化することができる。

アスタキサンチンの酸化防止活性はモル濃度比においてトコフェロールに比較して、いづれの酸化防止剤試験においても200倍以上の活性を示し、BHAと比較しても約10倍以上の酸化防止力を示した。

さらにビタミンE（トコフェロール）を含まない飼料で飼育したマウスは8週間でビタミンE欠乏症を示すが、アスタキサンチンをビタミンEを含まない飼料にビタミンEの必要量の1/100加えておくと、8週間後でもほとんどビタミンE欠乏に伴う臓器機能の症状を起こさなかった。またアスタキサンチンはビタミンE欠乏症を示すマウスを正常な状態に回復させる効果をも示した。

次に、本発明の組成物及び製剤について説明する。

本発明において酸化防止剤の活性成分として使

用するには高速攪拌器、ホモジナイザー等を用いて混合乳化すればよい。

また、本発明の医薬として、錠剤及び粉末のような固形投薬形態は、またはエリキシール、シロップおよび懸濁液のような液体投薬形態で経口投与される。また非経口投与的に、例えば注射剤及び座薬としても用いられる。これらの医薬の活性成分としてはアスタキサンチンは化学的に合成されたアスタキサンチンでも天然よりのアスタキサンチン及びそのエステル粗抽出エキスでもよく、これらを単独で、または適宜組み合わせて用いることができる。医薬用組成物に含まれる経口投薬としての補助剤は、例えば固形粉末上の担体、ラクトース、サッカロース、デキストロース、マンニット、ソルビット、セルロース、グリシンなどが挙げられる。また滑沢剤としては二酸化珪素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、結合剤として澱粉、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンな

どが例示される。崩壊剤としては澱粉、寒天などがある。本発明の医薬中の活性成分の投与量は成人に対して1日当り、普通10~4000mg好ましくは100~1000mgの服用量で経口投与を行うか、あるいは1~2000mg、好ましくは50~500mgの用量で非経口投与する。投与量は、投与される疾患の種類・患者の年齢、体重、症状の程度、投与形態によっても異なることは明かである。

本発明の医薬の活性成分の毒性は極めて低い。

以下、実施例及び参考例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではないことは言うまでもない。

参考例1. 赤色酵母(Phaffia rhodozyma Miller)の培養によるアスタキサンチン及びそのエステル粗抽出エキスの製造

酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.5%、およびブドウ糖1.0%からなる液体合成培地を坂口フラスコに100mlずつ5本に分注し、120℃、20分間オートクレーブで加熱滅菌した。これにファフィア・ロドジマ・ミラー株(ATCC-24201株)

ルを担体として10%酢酸エチル含有ジクロロメタンを展開溶媒とするカラムクロマトグラフィーに付し、主成分の赤色着色色素を分取した。さらにこの成分をエルマ社製BRC-CNを担体とした高速液体クロマトグラフィーを用いて、ヘキサン/ジクロロメタン(70:30)からヘキサン/ジクロロメタン/エタノール(70:30:30)へのグラジエント溶出を行うことによりアスタキサンチンを分離精製することができた。収率はファフィア乾燥分体1g当たり約1mgであった。第1図に高速液体クロマトグラフィーにおけるアスタキサンチンの溶出パターンを示す。

実施例1. 生体の酸化組織障害の防御(1)

アスタキサンチンによる、ジアル酸及び三価鉄が引き起こす正常ラット赤血球の脂質過酸化反応に対する阻害作用(酸化防止作用)

ジアル酸及び三価鉄が引き起こす正常ラット赤血球の過酸化反応をアスタキサンチンがいかに防止するかを以下のようにして測定した。

まず正常ラットの赤血球を採取し、KRP(ク

の純粋培養物を一白金耳接種し、25℃、72時間往復式振盪器で培養した。次に酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.5%、およびブドウ糖1.0%からなる液体合成培地25mlを50mlのジャーファーメンターに入れ120℃、20分間オートクレーブで加熱滅菌した。これに先の前培養液500mlを接種し、25℃で48時間、12l/min通気攪拌培養した。その後さらに1%分のブドウ糖を追加し、さらに48時間培養した。得られた培養液から遠心分離法により、湿重量で約500gの菌体を得ることができた。このようにして得られた菌体を凍結乾燥法により乾燥させた後、5倍重量のアセトンを加え、乳鉢中で機械的に菌体を破砕しながら抽出を行った。濾過法により残渣を除き、その残渣にさらにアセトン500mlを加え抽出を行い、この操作を2~3回繰り返した。得られた赤色アセトン抽出溶液を40℃以下で減圧濃縮することによりアスタキサンチン及びそのエステルの粗抽出エキスを得ることができた。

本粗抽出エキスをまずドライカラム用シリカゲ

レブス・リンガー・磷酸)緩衝液にて3回洗浄後、適量のアスタキサンチンを加え、あるいは加えずに三価鉄塩の水溶液(100mM)及びジアル酸水溶液(1mM)をそれぞれ最終その濃度になるように加えた。この状態で37℃20分間脂質過酸化反応を行った。この反応液(2ml)に40%トリクロロ酢酸水溶液(0.5ml)、5規定塩酸(0.25ml)、及び2%チオバルビト尿酸水溶液(0.5ml)を加えて100℃で15分間煮沸し、TBA反応(チオバルビト尿酸反応)を行った。反応液を遠心分離し(3000rpm、10分間)、上清を535nmの吸光度で過酸化脂質を定量し、脂質過酸化反応に及ぼすアスタキサンチンの阻害作用を(第2図)を調べた。アスタキサンチンは2mM以下の低濃度において、脂質の過酸化反応を50%以上阻害した。

実施例2. 生体の酸化組織障害の防御(2)

アスタキサンチンによる、二価鉄(モール塩)が引き起こす正常ラット肝臓ミトコンドリアの脂質過酸化反応に対する阻害作用(酸化防止作用)

二価鉄(モール塩)が引き起こす正常ラット肝

臓ミトコンドリアの過酸化反応をアスタキサンチンがいかに防止するかを以下のようにして測定した。

まず正常ラットの肝臓ミトコンドリアをホジブームらの方法により分離し、塩化カリウム(150mM)ートリス塩酸(10mM)(pH 7.4)緩衝液にて3回洗浄(8000g、10分間)した。次に塩化カリウム(150mM)ートリス塩酸(10mM)(pH 7.4)緩衝液に、適量のアスタキサンチンを加えた、あるいは加えない2mg/ml蛋白質量のミトコンドリアを加え最終50μlになるように二価鉄(モール塩)を添加した。この状態で37℃60分間脂質過酸化反応を行った。この反応液(2ml)に40%トリクロロ酢酸水溶液(0.5ml)、5規定塩酸(0.25ml)、及び2%チオバルビト尿酸水溶液(0.5ml)を加えて100℃で15分間煮沸し、TBA反応(チオバルビト尿酸反応)を行った。反応液を遠心分離(3000rpm、10分間)、上清を535nmの吸光度で過酸化脂質を定量し、脂質過酸化反応に及ぼすアスタキサンチンの阻害作用を(第3図)

価鉄(モール塩)を添加した。この状態で37℃60分間脂質過酸化反応を行った。この反応液(2ml)に40%トリクロロ酢酸水溶液(0.5ml)、5規定塩酸(0.25ml)、及び2%チオバルビト尿酸水溶液(0.5ml)を加えて100℃で15分間煮沸し、TBA(チオバルビト尿酸反応)反応を行った。反応液を遠心分離(3000rpm、10分間)、上清を535nmの吸光度で過酸化脂質の残存度(第4図)を調べた。アスタキサンチンはビタミンEと比較して、ラット肝臓のミトコンドリアの脂質の過酸化反応を約1/1000以上の低濃度で阻害した。

実施例4 生体の酸化阻害的組織障害の防御(4)

ビタミンE欠乏ラット及びビタミンE欠乏ではあるがアスタキサンチンを添加して飼育したラットの赤血球ゴーストにおける、スーパーオキシドアニオンラジカル-三価鉄による脂質過酸化反応の比較(酸化防止作用及びビタミンE代用効果) ビタミンE欠乏及びアスタキサンチン代用ラットはビタミンE欠乏飼料及びビタミンE欠乏アス

を調べた。アスタキサンチンは400mM以下の低濃度において、脂質の過酸化反応を50%以上阻害した。

実施例3 生体の酸化阻害的組織障害の防御(3)

アスタキサンチン及びビタミンEによる、二価鉄(モール塩)が引き起こす正常ラット肝臓ミトコンドリアの脂質過酸化反応に対する阻害作用の比較(酸化防止作用及びビタミンE代用効果)

二価鉄(モール塩)が引き起こす正常ラット肝臓ミトコンドリアの過酸化反応に対する阻害効果をアスタキサンチンとビタミンEで以下のようにして比較した。

まず正常ラットの肝臓ミトコンドリアをホジブームらの方法により分離し、塩化カリウム(150mM)ートリス塩酸(10mM)(pH 7.4)緩衝液にて3回洗浄(8000g、10分間)した。次に塩化カリウム(150mM)ートリス塩酸(10mM)(pH 7.4)緩衝液に、適量のアスタキサンチンまたはビタミンEを加えた、あるいは加えない2mg/ml蛋白質量のミトコンドリアを加え、最終100μlになるように二

タキサンチン代用飼料(4mg/160gのアスタキサンチンを含む飼料)でそれぞれ8週間飼育したものをを用い、赤血球を採取し、カルシウムフリーのKRP緩衝液にて3回洗浄(1300rpm、10分間)した。これを5mM磷酸緩衝液(pH 8.0)で0℃30分間溶血し、遠心分離(16000rpm、10分間)を行い沈渣としてゴーストを(ドッジの方法)得た。次にトリス-塩酸緩衝液(20mM、pH 7.5)に三価鉄(50μM)とキサンチン(200μM)をそれぞれの濃度になるように加え、キサンチンオキシダーゼ(16倍希釈したペーリンガーのもの、10μl/ml)、及び上記のゴースト(1mg/ml)を加えて37℃にて反応した。この反応は[スーパーオキシドアニオンラジカル-三価鉄]のヒドロキシラジカルによる過酸化反応で、スーパーオキシドアニオンラジカル依存性の反応である。この反応液(2ml)にて40%トリクロロ酢酸水溶液(0.5ml)、5規定塩酸(0.25ml)、及び2%チオバルビト尿酸水溶液(0.5ml)を加えて100℃で15分間煮沸し、TBA(チオバルビト尿酸

反応)を行った。反応液を遠心分離し(3000rpm、10分間)、上清を535nmの吸光度で過酸化脂質(マロンジアルデヒド)を定量し、その反応時間依存性(第5図)を調べた。その結果、正常ラットのゴーストでは全く過酸化反応が認められなかったにも関わらず、ビタミンE欠乏ラットでは強い過酸化反応が認められた。またビタミンE欠乏ではあるが、アスタキサンチンを投与したラットでは過酸化脂質の発生量がかなり抑えられることが分かった。

実施例5. 酸化阻害剤の防御(5)

ビタミンE欠乏ラット肝臓ミトコンドリアの二価鉄による脂質過酸化反応とそれに伴う呼吸調節能の低下、及びそれに対するアスタキサンチンの効果(酸化防止作用及びビタミンE代替効果)

ビタミンE欠乏ラットはビタミンE欠乏飼料で8週間飼育したものをを用い、肝臓ミトコンドリアをホジブームらの方法により分離し、塩化カリウム(150mM) - 塩化マグネシウム(3mM) - 磷酸緩衝液(5mM, pH 7.4)にて3回洗浄した。この肝

臓ミトコンドリアに適当な濃度の二価鉄(モール塩)を加え、または加えずに上記と同じ緩衝液で25℃にて反応した。その後コハク酸及びアデノシン二磷酸を順次加え、オキシメーターにて酸素消費を測定した。RCI(呼吸調節能)に関してはコハク酸添加後(スタート4)とアデノシン二磷酸添加後(スタート3)の酸素消費の時間依存性の比(スタート3/スタート4:チャンスのスタート)より求めた。またアスタキサンチンの上記過酸化反応に対する阻害効果は同様の方法で二価鉄を添加する前にアスタキサンチンを加え、酸素消費を測定し、RCIを求めた。

その結果、二価鉄イオンを添加しないラットのミトコンドリアではRCI=4.00を示したが、二価鉄イオン濃度が増加するに連れてその呼吸調節能が低下(第1表)した。またこの時、二価鉄イオンの添加により酸素の消費が認められるが、これは呼吸によるものではなく過酸化反応によるものであり、その酸素の消費は二価鉄イオンの濃度に依存した。またアスタキサンチンの上記過酸化

反応に対する阻害効果は、二価鉄イオンの添加前にアスタキサンチンを添加すると、加えたアスタキサンチンの濃度に依存して二価鉄イオンによる酸素消費は阻害され、低下したRCIも回復(第2表)した。

第1表

二価鉄イオンによるビタミンE欠乏ラットの肝臓ミトコンドリアの呼吸調節能の低下

イオン濃度(μM)	RCI(呼吸調節能)
0	4.00
10	3.37
40	2.92
100	2.44

第2表

二価鉄イオンによるビタミンE欠乏ラットの肝臓ミトコンドリアの呼吸調節能の低下に対するアスタキサンチンの阻害効果

イオン濃度(μM)	アスタキサンチン濃度(μM)	RCI(呼吸調節能)
100	0	2.02
100	42	2.64
100	420	3.21
100	4200	3.35

実施例6. カラゲニン誘発性足浮腫に対するアスタキサンチンの阻止効果(抗炎症効果)

エーテル麻酔下にウィスター系雄ラット(200g)の左足に0.2mlの生理的食塩水を、右足に10mg/mlのカラゲニンを含む同量の生理的食塩水を皮下投与してカラゲニン誘発性足浮腫をおこしてその足の体積の変化を経時的に測定した。対照群は1mlの1%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液を、実験群は1mgのα-トコフェロールあるいは1mgのアスタキサンチンを含む同量のCMC

溶液を30分前に腹腔内投与したラットを用いて測定した。

その結果、 α -トコフェロールには対照と同様の結果を示し、カラゲニン誘発性足浮腫に対する阻止効果は認められなかったが、アスタキサンチンには顕著な足浮腫に対する阻止効果(第6図)が認められた。

実施例7. 酸化防止効果

メチレンブルーの光反応による一重項酸素の発生に対するアスタキサンチンの阻止効果(酸化防止効果)

試験管中で、色素の一つであるメチレンブルー(1.0 μ m)を一重項酸素発生源として、1.0%(体積比)のリノール酸を含むエタノール溶液(1.0ml)を水1.0mlに溶解し、これに各種のカロテノイドを(それぞれ100 μ m)加えた。この溶液に1800ルクスの白色光を照射し、経時的に、メチレンブルーの光反応で発生した一重項酸素によるリノール酸の過酸化を次のようにして定量した。この反応液(2ml)に20%トリクロロ酢酸水溶

これはブレオマイシンやアルデヒド類等のフリーラジカルを生成する変異原に対して感受性の高いものである。陽性対照としてはマイトマイシンC(MMC)を用いた。また溶媒対照としてはジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。サンプルはアスタキサンチン単独、およびアスタキサンチンにMMCを加えたものの二種類とした。それぞれのサンプルはアスタキサンチンの濃度を最高5 μ g/プレートとし五段階の濃度について検討した。

まずアスタキサンチンのDMSO溶液を滅菌小試験管に分注し(アスタキサンチン単独のサンプルは100 μ l、それ以外は50 μ l)、アスタキサンチン単独以外のサンプルにはMMCを最終量が0.5 μ g/プレートになるように50 μ l加えた。次にそれぞれにナトリウム-過酸緩衝液(pH7.4)を0.5mlを加え、前培養した菌懸濁液0.1mlを加えた。これらを振盪培養高温槽で37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪しながらブレインキューベートし、軟かてんを2.5ml加え、泡が生じないように注意して混合し、最少グルコース寒天培地に注ぎ一様にプレート上

液、及び0.67%チオバルビト尿酸水溶液(0.5ml)を加えて100 $^{\circ}$ Cで15分間煮沸し、TBA反応(チオバルビト尿酸反応)を行った。反応後をエーテルで洗浄し、水層を530nmの吸光度で測定し、脂質過酸化反応に及ぼすアスタキサンチンの阻害作用を(第8図)を対照、 α -トコフェロール、及びアスタキサンチンのジエステル等と比較した。

その結果、アスタキサンチンを加えた系では長時間光照射を続けても過酸化脂質の発生が阻止されたのに対し、 α -トコフェロールを加えた系では時間と共に過酸化脂質の発生が対照と同様に発生することが観測された。またこれはアスタキサンチンのジエステルでも同様であった。

参考例2

アスタキサンチンの抗変異原性試験(酸化防止作用に伴う抗変異原効果)

エイムス/サルモネラテスト(ブレインキューベーション法)にてアスタキサンチンの抗変異原効果を調べた。用いた菌株はサルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium) TA102株で、

に広げた。これを37 $^{\circ}$ Cで2日間インキューベートしたのち、プレート上のサスト菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて調べ、復帰突然変異により生じたコロニー数(第7図)を数えた。

その結果、アスタキサンチン自体には突然変異原性は全く認められなかった。しかしMMCに対する抗変異原性は、最高濃度5 μ g/プレートのととき変異原性を34.5%抑制し、その効果が確認された。

製剤例1. 酸化防止剤又は外用薬(?)

油相部	(重量%)
アスタキサンチン	1.0 %
菜種油	39.0 %
コハク酸グリセリド	2.0 %
水相部	
L-アスコルビン酸	2.0 %
没食子酸	1.0 %
ケルセチン	1.0 %
ローカストビーンガム	0.1 %
水	53.9 %

ローカストビーンガムを溶解させた水を65℃に加熱してから没食子酸とL-アスコルビン酸とケルセチンを混合し、予め65℃で混合、溶解しておいた油相部を混合、攪拌後ホモジナイザーを通し、均質化後10℃まで冷却して上記配合の乳液状製剤を得た。

製剤例2. 酸化防止剤又は外用薬(7)

油相部	(重量%)
アスタキサンチン	1.0 %
菜種油	38.0 %
クエン酸モノグリセリド	2.0 %
水相部	
L-アスコルビン酸	2.0 %
没食子酸	1.0 %
ヘスペリジン	1.0 %
ローカストビーンガム	0.05 %
水	54.95 %

ローカストビーンガムを溶解させた水を65℃に加熱してから没食子酸とL-アスコルビン酸とヘスペリジンを混合し、予め65℃で混合、溶解

を加温混合、滅菌して注射剤とした。

製剤例6. 軟膏剤

アスタキサンチン	1.0 g
白色ワセリン	適量
芳香剤	適量
合 計	100 g

【発明の効果】

本発明で表わされるアスタキサンチン及びその製剤は実施例で述べたように各種酸化条件による脂質の過酸化反応を低濃度で強く阻害することから、食品、化粧品、及び医薬品等の酸化防止剤としての効果が期待できる。また生体系において各種酸化条件による組織破壊、組織損傷、変異原性あるいは癌物誘発の浮腫等の炎症に対する阻止効果が認められることから、機能性食品、化粧品、及び医薬品等の組成物としての利用法が期待できる。さらにアスタキサンチン及びその製剤はビタミンE欠乏により誘発される、各種症状に対してそれを防止、あるいは緩和する効果があることよ

しておいた油相部を混合、攪拌後ホモジナイザーを通し、均質化後10℃まで冷却して上記配合の乳液状製剤を得た。

製剤例3. 錠剤及びカプセル剤

	(重量%)
アスタキサンチン	10 %
乳糖	75 %
重質酸化マグネシウム	15 %

を均一に混合し、錠剤、又はカプセル剤とした。

製剤例4. 散剤及び顆粒剤

	(重量%)
アスタキサンチン	45 %
微粉	15 %
乳糖	40 %

を均一に混合し、散剤、顆粒剤とした。

製剤例5. 注射剤

	(重量%)
アスタキサンチン	1 %
溶解補助剤	5 %
生理食塩水	94 %

り、ビタミンEの代用物としての利用が期待できる。またビタミンEでも阻止できなかった色々な過酸化反応に由来する現象を阻止することが認められることから新たな機能性食品、化粧品、及び医薬品等の組成物としての素材の利用法が期待できる。

4. 図面の簡単な説明

第1図はアスタキサンチンの高速液体クロマトグラフィーによる溶出パターンを示したものである。

第2図は正常ラット赤血球のジアル酸及び三価鉄による脂質過酸化反応と、それに対するアスタキサンチンの阻害効果を表したものである。

第3図は正常ラット肝臓ミトコンドリアの二価鉄による脂質過酸化反応と、それに対するアスタキサンチンの阻害効果を表したものである。

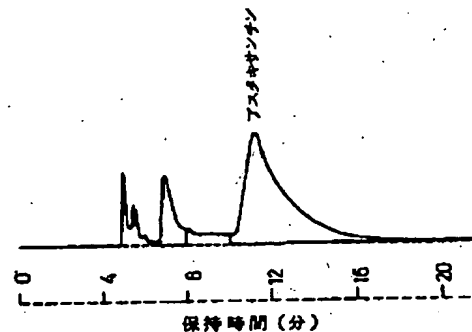
第4図は正常ラット肝臓ミトコンドリアの二価鉄による脂質過酸化反応と、それに対するアスタキサンチン及びビタミンEによる阻害効果を比較して表したものである。

第5図はビタミンE欠乏飼料、及びビタミンE欠乏飼料とアスタキサンチンを添加した飼料によって飼育したラットの、赤血球ゴーストにおけるスーパーオキシドアニオンラジカルと三価鉄による脂質過酸化反応の比較を表したものである。

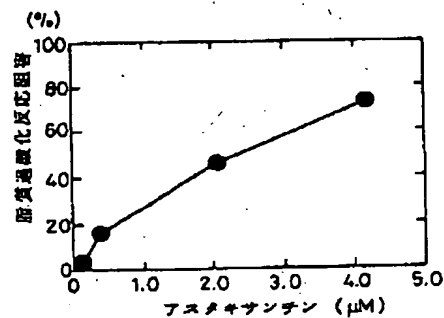
第6図はカラゲニン誘発性足痒症に対するアスタキサンチンの阻止効果を α -トコフェロールと比較したものである。

第7図はサルモネラ菌を用いた変異原性テストにおいて、アスタキサンチンがマイトマイシンCによって誘起される変異原性を抑制する様子を示したものである。

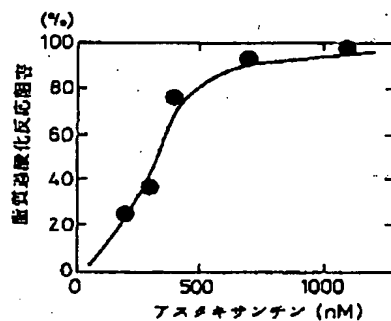
第8図はメチレンブルーの光反応による一重項酸素の発生に対するアスタキサンチンの阻止効果を、 α -トコフェロールやアスタキサンチンのジエステルと比較したものである。



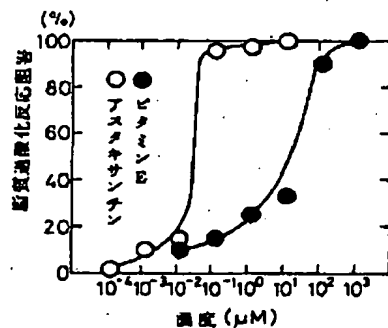
第 1 図



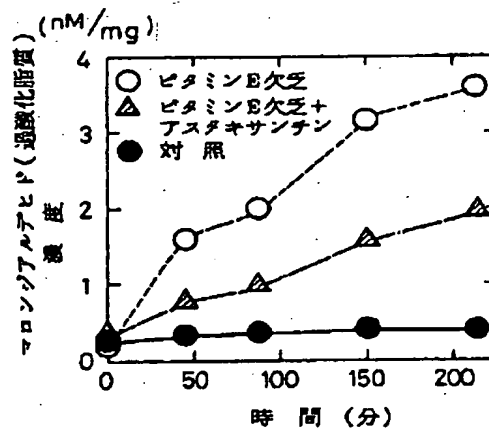
第 2 図



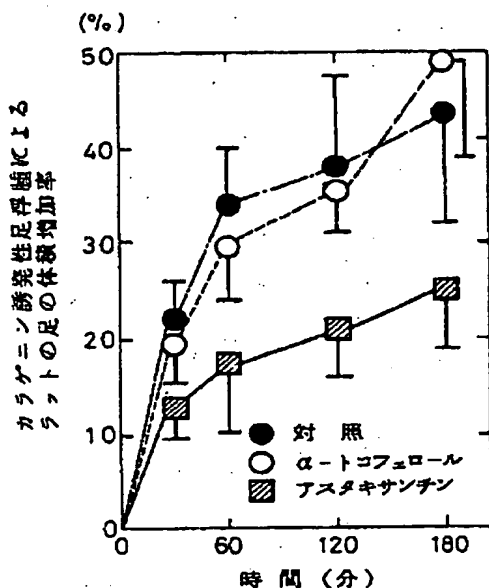
第 3 図



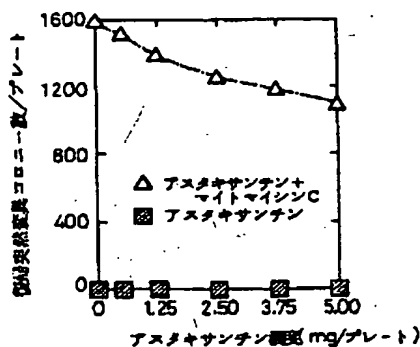
第 4 図



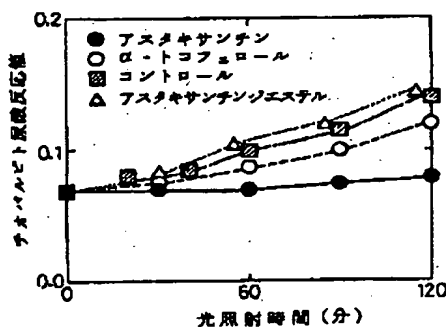
第 5 図



第 6 図



第 7 図



第 8 図

手続補正書 (自発)

昭和 63 年 9 月 29 日

特許庁長官 吉田文毅殿

1. 事件の表示

昭和 63 年 特許願 第 198947 号

2. 発明の名称

アスタキサンチン含有組成物

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (190) サントリー株式会社

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目 8 番 10 号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (6579) 青木 朗

(外 4 名)



5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書第 8 頁第 3 行目「赤色酵母」を「フアフィア酵母」に補正する。

(2) 同第 14 頁第 6 行目「注射剤」を「注射剤、軟膏剤、」に補正する。

(3) 同第 15 頁第 13 行目「赤色酵母」を「フアフィア酵母」に補正する。

(4) 同第 30 頁第 10 行目、及び第 31 頁第 7 行目「(?)」を削除する。